

University of Groningen

Een methode voor kwantitatieve bepaling van immunoglobulinen met enkele klinische toepassingen

Russchen, Cornelis Jacob

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
1969

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Russchen, C. J. (1969). *Een methode voor kwantitatieve bepaling van immunoglobulinen met enkele klinische toepassingen*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt een methode voor kwantitatieve bepaling van immuunglobulinen (IgG, IgA en IgM) beschreven, welke de afgelopen jaren door ons werd ontwikkeld. Tevens worden enkele klinische toepassingen van de methode besproken.

Hoofdstuk I geeft een overzicht van enkele belangrijke aspecten van immuunglobulinen. Behalve feiten betreffende voornamelijk de moleculaire structuur en de biologische functie van deze (serum)eiwitten worden enige gegevens over hypo-immuunglobulinaemie en paraproteïnaemie vermeld.

Hoofdstuk II bevat een beschouwing over de verschillende methoden voor kwantitatieve bepaling van immuunglobulinen. Wat betreft de immunodiffusietechnieken wordt achtereenvolgens aandacht besteed aan het principe van 'single-diffusion', 'double-diffusion' en immunoelectroforese. Er wordt gewezen op het onderscheid tussen 'kwantitatieve' methoden en 'semi-kwantitatieve' antigeentitratieprocedures. Kwantitatieve bepalingen zijn steeds gebaseerd op een lineair verband tussen een door het specifieke immuunprecipitaat verschaft 'meetbare variabele' en de (log. van de) antigeen (i.c. immuunglobuline)concentratie bij constante antilichaamconcentratie, waarbij gebruik wordt gemaakt van een met behulp van een standaard (met bekende immuunglobulineconcentratie) geconstrueerde ijklijn.

Voor kwantitatieve bepaling van immuunglobulinen wordt meestal het principe van 'single-diffusion' toegepast. Hierbij wordt het specifieke antiserum tevoren met de nog vloeibare agargel vermengd, waarna men de antigeenoplossing in de antiserum-agargel laat diffunderen. Kwantificering berust hierbij op het feit, dat de grootte van het ontwikkelde precipitaat een maat is voor de immuunglobulineconcentratie. Hoewel nog door enkele onderzoekers de lineaire 'single-diffusion' methode (in buisjes) volgens Oudin (1952) wordt gebruikt (fig. 6), past men tegenwoordig meestal de 'single-radial-diffusion' techniek toe. Hierbij diffundeert het antigeen (i.c. verdunningen van onbekende monsters) vanuit depots in een antiserum-agarplaat, waardoor cirkelvormig begrensde precipitaten ontstaan. Kwantitatieve bepaling volgens Mancini e.a. (1964) berust op het feit, dat er, wanneer de precipitaten zich volledig hebben ontwikkeld, een lineair verband bestaat tussen de oppervlakte van het precipitaat en de immuunglobulineconcentratie (fig. 7), terwijl kwantificering volgens Fahey & McKelvey (1965) is gebaseerd op het vrijwel lineaire verband tussen de diameter

van het precipitaat en de logaritme van de immuunglobulineconcentratie na diffusie gedurende ± 24 uur (fig. 9).

In *hoofdstuk III* wordt uiteengezet, hoe wij in 1963, toen de Mancini-methode nog niet bekend was, met behulp van ons ter beschikking staande agarplaten in Petrischalen en een 'rosetfiguur' van in de gel uitgeponste depots hebben getracht een 'kwantitatieve' methode te ontwikkelen. Toepassing van de 'double-diffusion' techniek volgens Ouchterlony (1948), waarbij antigeenoplossing en antiserum gelijktijdig vanuit verschillende depots in de gel diffunderen (fig. 11), bleek hierbij niet tot het gewenste resultaat te leiden. Daarna experimenteerden wij met het 'diffusie-handicap' principe, zoals werd beschreven door Feinberg (1956). Hierbij diffunderen antigeen en antilichaam niet gelijktijdig in de agargel, maar er vindt diffusie van het antiserum plaats gedurende 72 uur vanuit het centrale depot van een rosetfiguur, alvorens de perifere depots van antigeenverduningen worden voorzien ('antibody gradient' methode). Na 24 uur blijken zich rondom de antigeendepots precipitaten te hebben gevormd, die naar de zijde van het antiserumdepot paraboolvormig zijn begrensd. Bij hogere antigeenconcentratie wordt het precipitaat groter en de paraboolvormige begrenzing minder sterk gekromd (fig. 23). Nadat ons gebleken was, dat toepassing van het 'diffusie-handicap' principe op deze wijze ook geen goede mogelijkheid voor kwantificering bood, hebben wij het principe toegepast met uitsluitend de perifere depots van de rosetfiguur, waarbij deze afwisselend als antigeen- en antiserumdepot fungeerden. Hierbij werd gebruik gemaakt van een doorzichtig perspex plaatje (Feinberg, 1964), dat op de agargel wordt aangebracht en waarin ronde openingen zijn uitgeboord, die dienstdoen als depots voor de reagentia. Aangezien de gel niet wordt beschadigd, is men op deze wijze verzekerd van een strikte uniformiteit van de depots, wat de nauwkeurigheid bevordert. De aldus rond de antigeendepots ontstane precipitaten zijn symmetrisch paraboolvormig begrensd (fig. 28). Het bleek, dat er, na antigeendiffusie gedurende 24 uur, over een bepaald traject een praktisch lineair verband bestaat tussen de onderlinge afstand van de snijpunten van deze begrenzing beiderzijds met de 'as' naar het aangrenzende antiserumdepot en de log. van de antigeenconcentratie (fig. 29 en 30). Wanneer het antigeendepot en de twee aangrenzende antiserumdepots op één lijn zijn gebracht, kan de genoemde afstand eenvoudiger als breedtediameter van het dan ellipsvormige precipitaat worden gemeten (fig. 31). Voor de praktische toepassing van dit principe ontwierpen wij in een perspex plaatje (dikte 0.8 mm) een zeshoekig patroon van 12 ronde openingen (diameter 6 mm, onderlinge afstand 8 mm), waarbij de 6 openingen op de hoekpunten fungeren als antiserumdepot en de 6 tussenliggende openingen als antigeendepot (fig. 33).

Met deze methode bleek bepaling van IgG en IgA met voldoende gevoeligheid mogelijk te zijn. Voor IgM was dit, als gevolg van de door het hoge moleculairgewicht trage diffusie van het antigeen, niet het geval. Het IgM

precipitaat biedt echter wegens zijn sterker gekromde ellipsvorm de mogelijkheid ook de lengtediameter ervan nauwkeurig te meten (vergelijk fig. 34 en fig. 37). Bij verrassing bleek nu, dat de lengtediameter, eveneens na 24 uur, een redelijk gevoelig lineair verband toont met de log. van de antigeen (IgM)concentratie.

Het lineaire verband tussen de breedtediameter van het precipitaat en de log. van de IgG resp. IgA concentratie bleek geldig voor het traject tussen 9.8 en 13.3 mm (fig. 35 en 36), het lineaire verband tussen de lengtediameter en de log. van de IgM concentratie voor het traject 8.5-10.5 mm (fig. 38).

De methode kan het best worden betiteld als 'kwantitatieve diffusiehandicap methode'. Er werd melding van gemaakt op het 'Colloquium on Protides of the Biological Fluids' te Brugge in 1966.

In *hoofdstuk IV* wordt *sub A* vermeld, op welke wijze wij de specifieke antisera hebben bereid. Voor het verkrijgen van anti-IgG serum werden konijnen geïmmuniseerd met een zuiver preparaat van menselijk IgG, waarna het antiserum werd geabsorbeerd met een mengsel van Bence Jones I en Bence Jones II eiwit (fig. 40). Voor de bereiding van anti-IgA en anti-IgM serum werd geïmmuniseerd met een mengsel van enkele gedeeltelijk gezuiverde IgA resp. IgM paraproteïnesera, terwijl de antisera werden geabsorbeerd met navelstrengserum (fig. 41 en 42).

Sub B wordt verantwoording afgelegd van de gehanteerde antigene standaarden. Wij maakten gebruik van een standaardserum, namelijk het 'Normal Clinical Chemistry Control Serum' van Hyland Laboratories, dat in drooggevroren vorm in luchtdicht afgesloten flesjes in de handel wordt gebracht. De immuunglobulineconcentraties van dit serum hebben wij in drie verschillende laboratoria laten bepalen, waarna wij voor elk immuunglobuline het gemiddelde van de drie opgegeven waarden als gehalte van het serum hebben aangenomen. Aldus vonden wij als standaardserumconcentraties: IgG 11.6 mg/ml, IgA 2.2 mg/ml en IgM 0.7 mg/ml.

Sub C wordt verslag uitgebracht van de werkwijze, die door ons werd toegepast. Voor een procedure van een aantal bepalingen van eenzelfde immuunglobuline(klasse), IgG óf IgA óf IgM, worden vier met agargel gevulde Petrischalen gebruikt. Midden op de agargel wordt een perspex plaatje met het zeshoekige patroon van 12 openingen aangebracht (fig. 33). De 6 hockdepots worden elk voorzien van 0.05 ml van het betreffende specifieke antiserum (anti-IgG 1:1 verdund, anti-IgA en anti-IgM onverdund). Daarna worden de gesloten Petrischalen gedurende 72 uur in de broedstof bij 37°C geplaatst. Na afloop van deze periode worden de antigeendepots met serumverduunningen gevuld (0.05 ml per depot). Per agarplaat wordt één antigeendepot gereserveerd voor een standaardserumverduunning, terwijl de overige vijf depots bestemd zijn voor verduunningen

van vijf onbekende monsters. Elke plaat wordt in duplo ingezet, d.w.z. plaat 1 = plaat 2, en plaat 3 = plaat 4. De twee standaardserumverduningen van resp. plaat 1 en 2, en plaat 3 en 4 worden zodanig gekozen, dat de titers een factor 2 verschillen en beide op het 'lineaire traject' liggen. De enkelvoudige verduningen van de 10 onbekende monsters worden op het lineaire traject 'gegoekt' (fig. 43). Na incubatie gedurende nogmaals 24 uur worden de precipitaten 'afgelezen', d.w.z. voor IgG en IgA wordt de breedtediameter en voor IgM de lengtediameter van de (totaal 24) precipitaten microscopisch (met de nonius) gemeten. Vervolgens wordt met behulp van de twee gemiddelde waarden van de in duplo gemeten diameters van de precipitaten van de twee standaardserumverduningen een ijklijn geconstrueerd op semi-logaritmisch papier, waarna de gehalten van de onbekende monsters uit de gemiddelde waarden van de betreffende duplometingen door middel van interpolatie worden berekend (tabel VI en fig. 44). Op deze wijze is het mogelijk in een periode van een week de drie immuunglobulinewaarden van 10 sera te bepalen.

Sub D worden gegevens betreffende de gevoeligheid, nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid van de methode vermeld. De laagste (afgeronde) concentratie, die kan worden bepaald, is voor IgG en IgA 0.1 mg/ml, voor IgM < 0.05 mg/ml. Het kleinste concentratieverschil, dat kan worden onderscheiden, is voor IgG en IgA $2 \mu\text{g/ml}$, voor IgM $1 \mu\text{g/ml}$. Tevens wordt aangegeven, op welke wijze een betrouwbaarheidsinterval voor een enkele bepaling kan worden berekend. De reproduceerbaarheid werd onderzocht, door voor elk van de drie immuunglobulinen 10 bepalingen van het standaardserum op verschillende tijdstippen te verrichten. De variatiecoëfficiënt (de standaarddeviatie als percentage van het gemiddelde) van de resultaten bleek voor IgG en IgA $\pm 4\%$ en voor IgM $\pm 10\%$ te bedragen.

Sub E wordt de basis van het 'lineaire traject' van onze methode geanalyseerd. Er wordt aangetoond, dat op theoretische gronden geen lineair verband mogelijk is tussen de breedte- of lengtediameter van het precipitaat en de log. van de antigeenconcentratie. Aangezien er op de 'as' tijdens antigeendiffusie een 'dal'vormig antilichaamconcentratieniveau bestaat (fig. 53), wordt het verband tussen de breedtediameter van het precipitaat en de log. van de IgG resp. IgA concentratie in feite door een licht gekromde S-figuur weergegeven (fig. 55). Het 'berg'vormige antilichaamconcentratieniveau op de loodlijn op de as (fig. 58) heeft tot gevolg, dat het verband tussen de lengtediameter van het precipitaat en de log. van de IgM concentratie in werkelijkheid door een licht gekromde omgekeerde S-figuur wordt weergegeven (fig. 59). In beide gevallen berust het door ons geconstateerde 'lineaire traject' op het feit, dat de meting van de diameter blijkbaar niet voldoende gevoelig is om geringe afwijkingen van een lineair verband met de log. van de antigeenconcentratie te registreren. Dientengevolge wordt voor de breedtediameter (IgG en IgA) het middelste gedeelte van de S-vormige lijn (tussen 9.8 en 13.3 mm) en voor de lengtedia-

meter (IgM) het middelste gedeelte van de omgekeerd S-vormige lijn (tussen 8.5 en 10.5 mm) als rechtverlopend geïnterpreteerd (fig. 35, 36 en 38). Overigens kon worden aangetoond, dat op de lijnen, die door het middelpunt van het antigeendepot gaan en de aangrenzende antiserumdepots (aan tegenovergestelde kant) raken (fig. 60), het antilichaamconcentratieniveau minder sterk 'dal'vormig verloopt dan op de as. Het verband tussen de diameter van het precipitaat op deze raaklijn(en) en de log. van de IgG resp. IgA concentratie zal dientengevolge minder sterk S-vormig verlopen, waardoor de lengte van het 'lineaire traject' groter is dan op de as (fig. 61 en 62). Aangezien de diameter van het precipitaat op deze raaklijn(en) nauwkeurig kan worden gemeten, heeft deze werkwijze een (gering) praktisch voordeel voor de IgG en IgA bepalingen. Voor IgM bepalingen komt meting van de diameter van het precipitaat op de raaklijn(en) niet in aanmerking, aangezien dit een duidelijk verlies aan gevoeligheid met zich mee zou brengen.

Sub F wordt onze methode vergeleken met de 'single-radial-diffusion' techniek volgens Fahey & McKelvey (1965), door de voordiffusie van het antiserum gedurende 72 uur vanuit depots als min of meer gelijkwaardig te beschouwen met het tevoren mengen van het antiserum in de agargel. Onze methode blijkt o.a. de volgende nadelen te hebben: Een korter 'lineair traject', sterkere temperatuurgevoeligheid, onzuiniger antiserumgebruik en een langere tijdsduur. Daarentegen is het aanbrengen van het antiserum in depots minder bewerkelijk dan het mengen van het antiserum in de nog vloeibare agargel, terwijl de uniformiteit van de antigeendepots, dankzij het perspex plaatje, een gelijkmatiger ontwikkeling van de precipitaten garandeert dan bij de 'single-radial-diffusion' techniek. De reproduceerbaarheid van de resultaten van bepalingen met onze methode blijkt niet minder goed te zijn dan die van met behulp van de 'single-radial-diffusion' techniek volgens Fahey & McKelvey verrichte bepalingen.

Hoofdstuk V handelt over normaalwaarden. Na een algemene beschouwing, waarbij onder meer wordt gesteld, dat de verschillen in door diverse onderzoekers opgegeven normaalwaarden voornamelijk het gevolg zijn van het gebruik van verschillende standaarden, wordt het resultaat vermeld van het eigen onderzoek van immuunglobulinebepalingen bij 30 gezonde volwassenen (15 mannen en 15 vrouwen). Het blijkt, dat de waarden van elke klasse z.g. lognormaal zijn verdeeld. De berekende grenzen (mg/ml) van het 95% betrouwbaarheidsinterval zijn als volgt: IgG $8.3 \longleftrightarrow 18.7$; IgA $0.4 \longleftrightarrow 3.5$; IgM $0.3 \longleftrightarrow 1.5$. De grote spreiding van de normaalwaarden is in overeenstemming met de bevindingen van andere onderzoekers. Ook kon worden bevestigd, dat de gemiddelde IgM waarde van vrouwen iets hoger is dan die van mannen. Er bleek een geringe positieve correlatie te bestaan tussen de IgG en IgA waarden; echter niet tussen IgG en IgM, en tussen IgA en IgM. Bij 10 van de 30 proefpersonen werden de

bepalingen gedurende een jaar om de drie maanden herhaald. De individuele variabiliteit van de waarden in verloop van tijd bleek zeer gering te zijn. Eventuele seizoensinvloed kon niet worden aangetoond.

De grote spreiding van de normaalwaarden bemoeilijkt de interpretatie van een in het individuele geval onder abnormale omstandigheden gevonden waarde. Gezien de geringe individuele variabiliteit van de waarden in verloop van tijd onder normale omstandigheden zal kwantitatieve bepaling van immuunglobulinen het meest tot haar recht komen bij herhaald, z.g. longitudinaal onderzoek.

In *hoofdstuk VI* worden de resultaten besproken van het onderzoek van de serum-immuunglobulinewaarden in het verloop van hepatitis infectiosa en mononucleosis infectiosa. Bij 7 volwassen patienten met hepatitis infectiosa werden de serum-immuunglobulinen (IgG, IgA en IgM) bepaald in het begin van het icterische stadium en resp. één en drie maanden later (tabel XVI). Bij het eerste onderzoek waren de waarden van elke immuunglobulineklasse gemiddeld duidelijk verhoogd; het IgM bleek relatief het sterkst te zijn toegenomen. Drie maanden later, toen er geen tekenen van leverparenchymbeschadiging meer bestonden (normale SGPT waarde), was het IgM genormaliseerd, in tegenstelling tot het IgG en IgA. Het IgG toonde tijdens de periode van drie maanden geen significante verandering. Deze bevindingen zijn in overeenstemming met gegevens uit de literatuur. Het verloop van het IgM kan waarschijnlijk worden beschouwd als initiële reactie van het antilichaamproducerend apparaat op de antigene stimulatie door het hepatitisvirus, terwijl het verhoogd blijven van met name het IgG op aanhoudende antigene stimulatie wijst van mogelijk nog aanwezig hepatitisvirus, nadat de patient dus vaak reeds geruime tijd klinisch is genezen. Er konden geen significante correlaties worden vastgesteld tussen de waarden van de immuunglobulinen onderling, evenmin als tussen de immuunglobulinewaarden en respectievelijk de SGPT waarde en de mate van thymoltroebeling.

Op overeenkomstige wijze werden de immuunglobulinespiegels vervolgd bij 8 patienten met mononucleosis infectiosa (ziekte van Pfeiffer) (tabel XX). Ongeveer een week na de eerste ziekteverschijnselen bleken alle drie immuunglobulinewaarden gemiddeld significant verhoogd te zijn. Evenals bij hepatitis infectiosa was het IgM het sterkst toegenomen. Na drie maanden bleek de IgM waarde gemiddeld praktisch normaal te zijn geworden. In tegenstelling tot bij hepatitis infectiosa waren toen ook het IgG en IgA normaal geworden. Op grond van de bevindingen kan worden verondersteld, dat de antigene stimulatie bij mononucleosis infectiosa weliswaar in ongeveer even sterke mate als bij hepatitis infectiosa optreedt, maar dat zij van kortere duur is, mogelijk als gevolg van een snellere (functionele) eliminatie van het aetiologische agens (wellicht het z.g. Epstein-Barr virus). In tegenstelling tot andere auteurs konden wij geen significante positieve cor-

relatie vaststellen tussen de IgM waarde en de heterofiele antilichaamtiter (Paul & Bunnell).

Ter vergelijking met onze bevindingen bij hepatitis infectiosa en mononucleosis infectiosa hebben wij de immuunglobulinespiegels bepaald van enkele reeds in de genezingsfase verkerende tuberculosepatienten, waarbij toxische leverparenchymbeschadiging was opgetreden als gevolg van tuberculostatische therapie. Er werden hierbij geen verhoogde immuunglobulinewaarden gevonden, terwijl een maand nadat de pyrazinamide-resp. PAS medicatie was gestaakt en de aanvankelijk sterk verhoogde SGPT waarde inmiddels aanzienlijk was gedaald, de immuunglobulinespiegels niet significant veranderd bleken te zijn (tabel XXVI). Mede naar aanleiding van gegevens in de literatuur betreffende normale immuunglobulinewaarden bij patienten met galstuwings, is het verleidelijk in het algemeen te stellen, dat, wanneer een acute leverparenchymbeschadiging gepaard gaat met normale immuunglobulinespiegels, een infectieuze oorzaak onwaarschijnlijk is.

In *hoofdstuk VII* wordt verslag uitgebracht van het onderzoek van de serum-immuunglobulinen bij enkele patienten met M. Besnier-Boeck, chronische obstructieve longziekten (CARA), en aspergillose tijdens langdurige behandeling met corticosteroiden.

Bij 7 patienten met M. Besnier-Boeck, waarbij naast dubbelzijdige hiluskliezwelling (long)parenchymafwijkingen bestonden met aanwijzingen voor fibrosering, werden de immuunglobulinen (IgG, IgA en IgM) bepaald kort vóór het begin van de behandeling met prednisolon (in een onderhoudsdosering van 15 mg per dag onder bescherming van INH) en resp. 3 en 9 maanden later (tabel XXVII). Bij het eerste onderzoek was uitsluitend de IgA waarde gemiddeld verhoogd, terwijl bij de controles tijdens de behandeling, zowel na 3 als na 9 maanden, alle drie immuunglobulinen normaal bleken te zijn. Opvallend is, dat de immuunglobulinewaarden gedurende de gehele periode van 9 maanden een, zij het geringe, daling vertoonden. De daling bleek relatief het sterkst voor IgG en IgA gedurende de eerste drie maanden. Men kan de bevindingen verklaren als gevolg van vermindering van de immuunglobulinenproductie (antilichaamsynthese), doordat onder invloed van corticosteroiden (i.c. prednisolon) lymfocyten te gronde gaan. Tijdens de behandeling met prednisolon trad duidelijke verbetering op van de röntgenologische afwijkingen door het in omvang afnemen van de voor de ziekte kenmerkende granulomateuze veranderingen. Aangezien men de vorming van granulomateus weefsel beschouwt als uiting van een bepaald immunologisch reactiepatroon van het organisme, kan bovengenoemde verbetering worden verklaard als gevolg van de immunosuppressieve werking van corticosteroiden. De gemiddeld verhoogde uitgangswaarde van het IgA bij onze patienten is in overeenstemming met gegevens uit de literatuur. Verhoging van IgG treedt meestal pas op in een nog verder gevorderd stadium van het ziekteproces. Naar aanleiding van het feit, dat andere auteurs bij patienten met pneu-

moconiosis en ernstige longfibrose in het verhoogde serum-IgA tegen fibroblasten gerichte auto-antilichaamactiviteit konden aantonen, lijkt het ons niet denkbeeldig, dat ook bij M. Besnier-Boeck, gezien de neiging tot fibrosing bij deze ziekte, de verhoogde IgA waarden mede het gevolg zijn van de aanwezigheid van een dergelijke auto-antilichaamactiviteit. Er konden geen significante correlaties worden vastgesteld tussen de waarden van de immuunglobulinen onderling, evenmin als tussen de procentuele veranderingen van de waarden van de verschillende klassen.

Op overeenkomstige wijze werden de immuunglobulinespiegels vervolgd bij 6 patienten met chronische obstructieve longziekten (CARA) tijdens behandeling met prednisolon, 15 mg d.d. (tabel XXX). Het betrof CARA-patienten met een sterk gestoorde longfunctie, voornamelijk in de zin van bronchusobstructie. Er bleek in lichte mate een allergische factor aanwezig te zijn, terwijl anamnestic de frequentie van luchtweginfecties betrekkelijk gering was. Zowel kort vóór het begin van de behandeling als bij de controles na resp. 3 en 9 maanden werden gemiddeld normale immuunglobulinewaarden gevonden. Gedurende de periode van 9 maanden bleken de waarden van elke klasse een geringe daling te vertonen. Ook hiervoor kan de immunosuppressieve werking van corticosteroiden (als gevolg van vernietiging van lymfocyten) verantwoordelijk worden gesteld. Bij de klinische verbetering van de patienten speelt echter waarschijnlijk de vermindering van de in de door ons bepaalde immuunglobulinen (IgG, IgA en IgM) gelocaliseerde antilichaamactiviteit niet de belangrijkste rol. Men heeft namelijk gevonden, dat bij allergische CARA-patienten een selectieve verhoging van het IgE bestaat. In deze immuunglobulineklasse is de 'reaginen'-activiteit gelocaliseerd, welke verantwoordelijk is voor z.g. type I ('immediate type')reacties, die bij CARA met een allergische component van veel betekenis zijn.

Een bevinding van andere auteurs, dat bij emfyseem een selectieve verhoging van het serum-IgA gehalte zou bestaan, konden wij bij onderzoek van 7 emfyseem-patienten (zonder tekenen van longfibrose) niet bevestigen.

Tenslotte hebben wij immuunglobulinewaarden bepaald bij 4 patienten met aspergillose kort vóór het begin van de behandeling met corticosteroiden en resp. 2 en 3 jaar later (tabel XXXIV). De bevindingen werden gecorreleerd met het in onze kliniek door Stevens en Hilvering bepaalde gehalte van tegen *Aspergillus fumigatus* gerichte specifieke precipitinen. Na behandeling gedurende twee jaar bleek het aanvankelijk verhoogde IgG te zijn genormaliseerd, terwijl tijdens deze periode het gehalte aan precipitinen, waarvan bekend is, dat zij vrijwel uitsluitend tot het IgG behoren, aanmerkelijk was verminderd. De verhoogde gemiddelde uitgangswaarde van IgA kan mogelijk ten dele worden verklaard door het feit, dat bij één van de patienten een complicerende M. Besnier-Boeck bestond. Na behandeling gedurende drie jaar bleken de IgA waarden normaal te zijn geworden. Het gemiddeld normale IgM van de patienten toonde geen significante verandering.

SUMMARY

This thesis describes a method for the quantitative determination of immunoglobulins (IgG, IgA and IgM) and discusses some clinical applications.

Chapter I reviews some basic aspects of immunoglobulins. The molecular structure and biological function of these (serum)proteins are discussed, and hypo-immunoglobulinaemia and paraproteinaemia are briefly considered.

Chapter II describes the various methods for quantitative estimation of the immunoglobulins. The principles of the immunodiffusion techniques - single diffusion, double diffusion and immunoelectrophoresis - are explained. Quantitative methods must be distinguished from semi-quantitative antigen titration procedures. Quantitative determinations are always based on a linear relationship between a measurable variable (provided by the specific immune precipitate) and the (log of the) antigen (i.e. immunoglobulin) concentration at constant antibody concentration. A standard containing a known quantity of immunoglobulin is used to make a reference line.

In general, single diffusion techniques are used for quantitative determination of immunoglobulins. The specific antiserum is mixed with the fluid agar gel prior to cooling, after which the antigen solution is allowed to diffuse into the antiserum-agar gel. The size of the precipitate which develops is a measure for the immunoglobulin concentration. Although the linear single-diffusion method (in tubes) of Oudin (1952) is still used by some workers (fig. 6), single-radial-diffusion is at present more popular. In this method the antigen (i.e. dilutions of unknown sera) diffuses out of depots in an antiserum-agar plate, leading to circular areas of precipitation. The quantitative method of Mancini et al. (1964) is based on the fact that, once the precipitates have completely developed, a linear relationship exists between the area of the precipitate and the immunoglobulin concentration (fig. 7). The method of Fahey and McKelvey (1965) is based on the almost linear relationship between the diameter of the precipitate and the logarithm of the immunoglobulin concentration, after diffusion for approximately 24 hours (fig. 9).

Chapter III tells how we tried in 1963, before the Mancini-method became known, to develop a quantitative method using agar plates in Petri dishes with a rosette figure of depots punched out of the agar gel. The application of the double-diffusion technique of Ouchterlony (1948), whereby antigen and antiserum diffuse simultaneously into the gel from

different depots (fig. 11), did not lead to much. We then experimented with the diffusion-handicap procedure, which was described by Feinberg in 1956. The antigen and antibody do not diffuse simultaneously into the agar gel, but the antiserum is allowed to diffuse from the central depot of a rosette figure for 72 hours before the peripheral depots are filled with antigen dilutions (antibody gradient method). During the following 24 hours precipitates appear round the antigen depots, forming a parabolic border on the side of the antiserum depot. With higher concentrations of antigen the area of precipitate increases and the parabolic border becomes straighter (fig. 23). After it had proved that the application of the diffusion-handicap procedure in this manner also failed to provide a satisfactory quantitative method, we applied the same principle using only the peripheral depots of the rosette. These functioned as alternate antigen and antiserum depots. We made use of a transparent perspex template (Feinberg, 1964) in which holes have been bored and which is placed on the agar gel. The holes serve as depots for the reagents. The gel is not damaged and the depots are strictly uniform, thus increasing the accuracy of the technique. The precipitates which form round the antigen depots have a symmetrical parabolic border (fig. 28). After antigen diffusion for 24 hours, it appeared that a linear relationship exists for the distance between the points on both sides where the precipitate border crosses the axial lines, and the logarithm of the antigen concentration (fig. 29 and 30). When the antigen depot and the two adjacent antiserum depots are placed in line, the 'width-diameter' of the then elliptic precipitate is more easily measured (fig. 31). For the practical application of this principle we developed a perspex template 0.8 mm thick with a hexagonal pattern of 12 holes (6 mm diameter and separated by 8 mm), in which the 6 corner holes function as antiserum depots and the 6 between as antigen depots (fig. 33).

Using this method an adequately sensitive determination of IgG and IgA was possible. It was, however, not feasible with IgM due to the high molecular weight which causes a slow diffusion of antigen. Because the ellipse has a sharper curve, the length diameter of the IgM precipitate can be measured quite accurately (compare fig. 37 with fig. 34). To our surprise, it appeared that the length-diameter (also after 24 hours) had a reasonably sensitive linear relationship to the log of the antigen (IgM) concentration.

The linear relationship between the width-diameter of the precipitate and the log of both IgG and IgA concentrations is valid for distances between 9.8 mm and 13.3 mm (fig. 35 and 36), and between the length-diameter and the log of the IgM concentration for distances between 8.5 mm and 10.5 mm (fig. 38).

This technique is best called a 'quantitative diffusion-handicap method'. It was reported at the 'Colloquium on Protides of the Biological Fluids' at Bruges in 1966.

Chapter IV. Subsection A describes how we prepared the specific antisera. To obtain anti-IgG serum, rabbits were immunized with a pure pre-

paration of human IgG, and the antiserum was then absorbed with a mixture of Bence Jones I and Bence Jones II proteins (fig. 40). For the preparation of anti-IgA and anti-IgM sera, a mixture of partially purified IgA and IgM paraproteins, respectively, were used for immunization, while the antisera were absorbed with umbilical cord serum (fig. 41 and 42).

Subsection B gives an account of the standardization. We used a standard serum, namely the 'Normal Clinical Chemistry Control Serum' of Hyland Laboratories, which is commercially available in freeze-dried form in small air tight bottles. We had the immunoglobulin concentrations of this serum determined in three different laboratories, and took the mean of the three values for each of the immunoglobulins as the standard value. We obtained the following standard serum concentrations: IgG 11.6 mg/ml, IgA 2.2 mg/ml and IgM 0.7 mg/ml.

Subsection C describes the technical procedure which we used. For several determinations of a single immunoglobulin (class) - IgG, IgA or IgM - 4 Petri dishes filled with agar gel are used. A perspex template with the hexagonal pattern of 12 holes is placed in the middle of the agar gel (fig. 33). Each of the 6 corner holes is supplied with 0.05 ml of the specific antiserum (anti-IgG 1 : 1 dilution, anti-IgA and anti-IgM undiluted). The closed Petri dishes are then placed in an incubator at 37°C for 72 hours. After this period the antigen depots are filled with serum dilutions (0.05 ml per depot). In each agar plate one antigen hole is reserved for the standard solution, the remaining 5 being used for the 5 unknown specimens. Every plate is done in duplicate (i.e. plate 1 = plate 2 and plate 3 = plate 4). The two standard dilutions on plates 1 and 2 and plates 3 and 4 respectively are chosen so that their titres differ by the factor 2, and that both lie on the 'linear stretch'. In diluting the 10 unknown specimens, a rough guess is made so that they too will come to lie on the linear stretch (fig. 43). After a further 24 hours of incubation the precipitates are 'read'. The width-diameter is measured microscopically for IgG and IgA, and the length-diameter for IgM. Using the mean values for the diameters of the two standard serum dilutions precipitates, a reference line is drawn on semi-logarithmic paper. By interpolation of the mean of the duplicated readings, the values for the unknown specimens can be derived (table VI and fig. 44). In this way it is possible to quantitatively determine the 3 immunoglobulins in 10 sera within a week.

Subsection D discusses the sensitivity, accuracy and reproducibility of the method. The lowest concentration (in rounded numbers) which can be determined is 0.1 mg/ml for IgG and IgA, and <0.05 mg/ml for IgM. The smallest difference in concentration which can be distinguished is 2 µg/ml for IgG and IgA, and 1 µg/ml for IgM. The method for determining the range of accuracy for a single determination is given. The reproducibility was investigated by performing 10 investigations of each of the 3 immuno-

globulins of the standard serum at different times. The coefficient of variation (the standard deviation expressed as a percentage of the mean) of the results was $\pm 4\%$ for IgG and IgA, and $\pm 10\%$ for IgM.

Subsection E analyses the basis of the 'linear stretch' of our method. Theoretically it is impossible to obtain a linear relationship between the width-or length diameter of the precipitate and the log of the antigen concentration. Due to the formation of a 'valley-like' antibody concentration level on the axis during antigen diffusion (fig. 53), the relationship between the width-diameter of the precipitate and the log of the IgG or IgA concentration is in fact represented by a lightly-curved S-shaped figure (fig. 55). The 'hill-like' antibody concentration level on the perpendicular to the axis results in a relationship between the length-diameter of the precipitate and the log of the IgM concentration which can be represented as a lightly-curved inverted S (fig. 59). In both cases the 'linear stretch' found by us results from the fact that the measurements of the diameter are not sensitive enough to register the slight difference of the S-form from a linear relationship. Thus, for practical purposes, for a width-diameter between 9.8 and 13.3 mm. (IgG and IgA) and for a length-diameter between 8.5 and 10.5 mm (IgM), the middle section of the S and inverted-S respectively can be regarded as straight (fig. 35, 36 and 38). It was further demonstrated that the antibody concentration levels were less 'valley-like' on the tangents of the adjacent antibody depots through the midpoint of the antigen depot, than on the axis (fig. 60). The relationship between the diameter of the precipitate on a tangent and the log of the IgG or IgA concentration is therefore less S-shaped, and the length of the 'linear stretch' greater (fig. 61 and 62). As the diameter of the precipitate on the tangents can be measured exactly, this method has a slight practical advantage over that using the axis for IgG and IgA determinations. For IgM determinations, measurement of the diameter of the precipitates on the tangents is unsatisfactory as it leads to a definite decrease in sensitivity.

Finally, in Subsection F, our method is compared with the 'single-radial-diffusion' technique of Fahey and McKelvey (1965), regarding the pre-diffusion of antiserum for 72 hours from depots as more or less equivalent to the premixing of the antiserum with the agar gel. Our method appears to have i.a. the following drawbacks: a shorter 'linear stretch', greater temperature sensitivity, more waste of antiserum and a longer duration. On the other hand the pipetting of antiserum into depots is a simpler procedure than the mixing of the antiserum with the still fluid agar gel, and the uniformity of the antigen depots due to the perspex plate guarantees a more even development of precipitates than does the 'single-radial-diffusion' technique. The reproducibility of results with our method is no less satisfactory than with the 'single-radial-diffusion' method of Fahey and McKelvey.

Chapter V deals with the normal values. It is pointed out that the differences between the values given by several authors are mainly due to the use of different standards. The results of our investigation of immunoglobulin levels in 30 healthy adults (15 men and 15 women) are presented. It appears that the values for each class are distributed in so-called log-normal fashion. The 95% confidence intervals (mg/ml) were found to be: IgG 8.3 \longleftrightarrow 18.7; IgA 0.4 \longleftrightarrow 3.5; IgM 0.3 \longleftrightarrow 1.5. The wide range in normal values is in accordance with the findings of other workers. It was also shown that the mean IgM value was higher in women than men. A slight positive correlation existed between IgG and IgA, but not between IgG and IgM or IgA and IgM. The determinations were repeated at three-monthly intervals for a year in 10 of the 30 subjects. The variation in values in the individual was very slight. Seasonal fluctuations could not be demonstrated. The wide range in normal values makes the interpretation of a value found in an individual under pathological conditions difficult. Due to the constant levels in the individual under normal circumstances, the most important application of quantitative determination of immunoglobulins will be in repeated, so-called longitudinal investigation.

Chapter VI describes the results of an investigation of the serum immunoglobulin values during the course of infectious hepatitis and infectious mononucleosis (Pfeiffer's disease). The immunoglobulins (IgG, IgA and IgM) were determined in 7 adult patients with infectious hepatitis at the start of the jaundice and one month and three months later (table XVI). At the first investigation the mean value of each immunoglobulin class was increased; the IgM showed relatively the greatest increase. Three months later, after all signs of liver parenchymal damage had disappeared (normal SGPT values), the IgM level was normal, as opposed to the IgG and IgA. During the period of three months the IgG showed no significant change. These findings are in accordance with those described in the literature. The course of the IgM can probably be regarded as the initial reaction of the antibody apparatus to the antigen stimulation by the hepatitis virus. The continuing raised level of the IgG can possibly signify antigen stimulation by a still-present hepatitis virus (often after the patient has clinically recovered). No significant correlations were found between the immunoglobulin classes, or between the immunoglobulin values and the SGPT or thymol turbidity.

In similar fashion the immunoglobulin levels were followed in 8 patients with infectious mononucleosis (Pfeiffer's disease). Approximately one week after the first symptoms, the mean value of each immunoglobulin class was significantly raised. As with infectious hepatitis, the IgM was increased the most. After three months the IgM values were practically normal. In contrast to infectious hepatitis the IgG and IgA levels also fell to the normal range (table XX). From the findings it may be assumed that the antigen stimulation in infectious mononucleosis occurs in approximately the same degree as in infectious hepatitis, but is of shorter duration,

possibly due to a more rapid (functional) elimination of the causative agent (probably the Epstein-Barr virus). Unlike other authors, we could find no significant positive correlation between the IgM value and the heterophile antibody titre (Paul-Bunnell).

For comparison with our findings in infectious hepatitis and infectious mononucleosis, we determined the immunoglobulin levels of a few patients with tuberculosis in the healing phase, in whom toxic liver parenchymal damage had occurred as a result of tuberculostatic treatment. Raised immunoglobulin values were not found, and there were no significant changes in the levels one month after the pyrazinamide or PAS therapy had been stopped and the previously greatly increased SGPT values had returned to normal (table XXVI). In view of these findings, and those in the literature concerning normal immunoglobulin values in cholestatic jaundice, it is tempting to postulate that when acute liver parenchymal damage is associated with normal immunoglobulin levels, an infectious cause is unlikely.

In *chapter VII* the results are given of the investigation of the serum immunoglobulins in a few patients with Besnier-Boeck's sarcoidosis, chronic obstructive lung diseases (CNSLD) and aspergillosis, during long-term steroid therapy.

Seven patients with sarcoidosis were used for the study; all had, in addition to bilateral hilar lymphadenopathy, evidence for lung parenchymal changes and fibrosis. Prednisolon was given in a continuation dosage of 15 mg per day under INH protection. The serum immunoglobulins (IgG, IgA and IgM) were determined shortly before starting treatment and three and nine months later. At the first investigation, only the IgA level was raised, while during treatment, at both 3 and 9 months, the mean values for all three immunoglobulins were normal (table XXVII). It furthermore appeared that during the nine months all three immunoglobulin levels showed a slight decrease, which was relatively the most for IgG and IgA during the first three months. These findings can be explained as a result of the diminished immunoglobulin production (antibody synthesis) due to the damaging effect of corticosteroids (prednisolon) on the lymphocytes. During the treatment a distinct improvement of the radiological appearances was observed, as a result of the decrease in size of the characteristic granulomatous lesions. Since the development of granulomatous tissue is regarded as an expression of a certain type of immunological reaction by the organism, the improvement described above can be explained on the grounds of the immunosuppressive activity of the corticosteroids. The mean raised initial value of IgA in our patients is in accordance with findings in the literature. An increase in the IgG is usually only seen in a later stage in the disease process. In view of the fact that other workers have described specific auto-antibody activity against fibroblasts localized in the increased IgA in patients with pneumoconiosis and severe lung fibrosis, it seems possible that in sarcoidosis, with its tendency to fibrosis, the raised IgA levels may also in part be due to similar auto-

antibody activity. No significant correlations could be found between the separate immunoglobulin levels, or between the proportional changes of the different classes.

The immunoglobulin values were followed in similar fashion in 6 patients with chronic obstructive lung diseases (CNSLD) during therapy with prednisolon (15 mg per day). The patients had severely disturbed pulmonary function, mainly in the form of bronchial obstruction. There was a slight allergic factor and from the history the frequency of respiratory infections appeared to be relatively low. Both shortly before the start of treatment and at 3 and 9 months, the mean values were found to be normal (table XXX). During the 9 months each class showed a slight decrease in level. Here also the immunosuppressive action of the corticosteroids (as a result of destruction of lymphocytes) is probably responsible. The clinical improvement in the patients is probably not mainly related to the decrease in the levels of the immunoglobulins which we determined (IgG, IgA and IgM). A selective increase of IgE has been found by others in allergic CNSLD-patients. The 'reagin' activity is localized in this class, which is responsible for the so-called type I ('immediate type') reactions, which are important in CNSLD with an allergic component.

We could not corroborate the findings of the authors who found a selectively raised serum IgA level in emphysema patients. In 7 patients with emphysema (without evidence of lung fibrosis) the IgA was normal.

Finally we determined the immunoglobulin values in 4 patients with aspergillosis shortly before starting treatment with corticosteroids, and 2 and 3 years later (table XXXIV). The findings were correlated with the level of specific precipitins against *Aspergillus fumigatus* (determined in our clinic by Stevens and Hilvering). After treatment for 2 years, the initially raised IgG level was normal, and the level of precipitins (which are known to belong mainly to the IgG class) was significantly diminished. The raised mean initial value for IgA is possibly in part explained by the fact that in one patient the growth of aspergillus was a complication of sarcoidosis. After treatment for three years the IgA values were normal. The normal mean IgM value of the patients showed no significant change.

510
1563